

# SEPARATION REPORT

## セミマイクロカラムによる血中薬物の分析

—— カラムスイッチング自動前処理による血中薬物の微量分析 ——

### —— 目 次 ——

	ページ
1. はじめに	2
2. 前処理カラム（固相抽出カラム）による抽出の原理	2
3. 前処理条件の設定	4
3-1. 前処理液及び洗浄液	4
3-2. 試料希釈液	4
3-3. 前処理カラム内径とカラム接続方向の影響	6
4. コンベンショナルカラムとの比較	6
4-1. 測定時間と検出感度の比較	6
4-2. 試料注入量と再現性	7
4-3. 血清での回収率及び再現性	8
5. 応用例	9
5-1. リドカインの分析	9
5-2. プレドニゾロンの分析	10
6. おわりに	11

## 1. はじめに

血中薬物の濃度測定は、薬物モニタリング療法（TDM）を適正かつ計画的に行う上で重要であり、また、迅速で正確な測定方法が望まれています。<sup>1)</sup> 実際の薬物投与においては複数の薬物が併用投与されることも多く、複数の薬物を同時に測定することができる高速液体クロマトグラフィー法（HPLC法）が広く普及しています。一般に血液などの生体試料中の薬物測定では、有機溶媒等による除タンパクや抽出、濃縮などの煩雑な前処理が必要となりますが、オンライン固相抽出を用いたカラムスイッチングHPLC法は、これら煩雑な前処理を行うことなく、簡便に生体試料中の薬物の測定を行うことができます。<sup>2)~6)</sup>

また、カラムスイッチングHPLC法は、固相抽出カラム（以下前処理カラムと略す）により除タンパクと同時に濃縮を行うことができるため効率良く高感度測定が行えます。さらに、セミマイクロカラムを用いれば、コンベンショナルカラム（内径4.6mm）に比べ高感度な分析を行うこと

ができるため、より微量な薬物の分離分析を行うことが可能となります。本稿では、前処理カラムによる抽出の原理とTSKprecolumn BSA-ODS/Sにおける前処理条件の設定法及び抗てんかん薬を用いたセミマイクロカラムとコンベンショナルカラムの感度比較と応用例について述べます。

## 2. 前処理カラム（固相抽出カラム）による抽出の原理

図-1に前処理カラムとHPLCを組み合わせた、カラムスイッチングHPLC法のフローチャートを示します。

前処理には、生体試料中に含まれるタンパク質などの高分子物質は保持せず目的の低分子物質を保持できる性能が要求されます。この条件を満たす代表的なカラムに、タンパク質が浸透できない細孔径を有したODSゲルの表面を変性アルブミン（BSA）でコーティングした、前処理カラム TSKprecolumn BSA-ODS/Sがあります。図-2のTSKprecolumn BSA-ODS/Sの前処理模式図に示すように、前処理液で平衡化された前処理カラムに生体試料を注入す

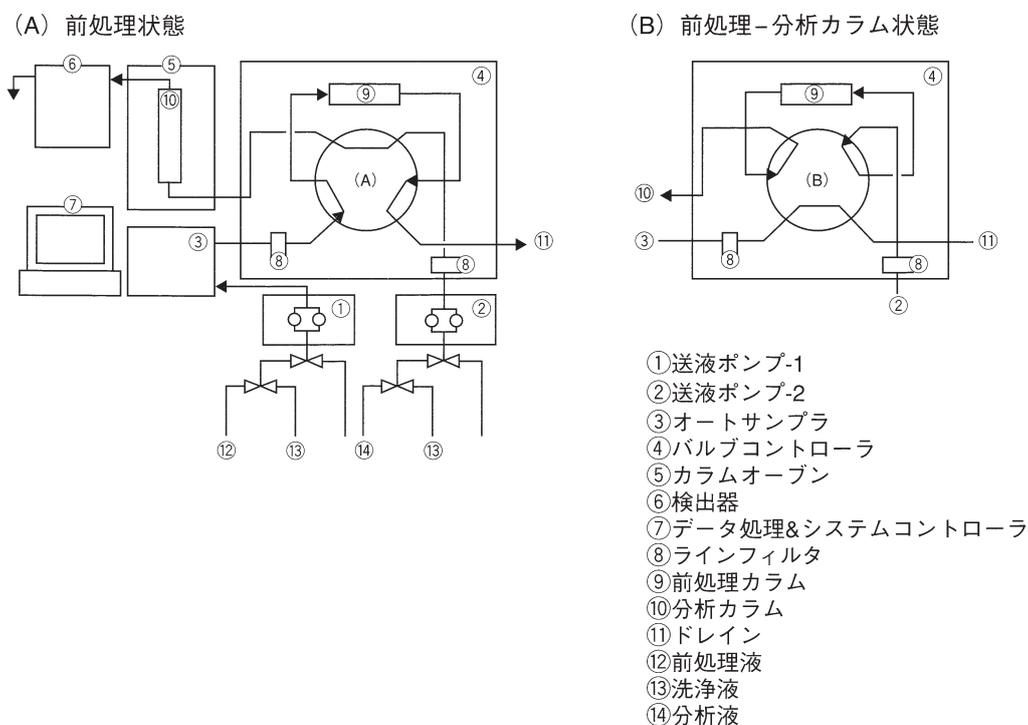


図-1 カラムスイッチングHPLC法のフローチャート

ると、生体試料中に含まれている目的物である薬物等の低分子物質は、充てん剤の細孔内に浸透しODS相に分配します。しかしながら、高分子物質であるタンパク質は細孔内に浸透できず、また、充てん剤表面が変性アルブミンでコーティングされているため充てん剤に保持されることなく溶出します。このようにして前処理カラムで除タンパク及び目的物質の濃縮が行われます。次に前処理カラムに有機溶媒を含む溶離液を流すことにより、ODS相に分配した低分子物質が溶離液に分配し前処理カラムから溶出します。同様な原理を用いた前処理カラムとして親水性ポリマー充てん剤であるTSKprecolumn PWや親水性シリカ充て

ん剤のTSKprecolumn SWがあります。前処理カラムの薬物に対する保持力の強さは、TSKprecolumn BSA-ODS/S (= TSKprecolumn BSA-ODS) > TSKprecolumn PW > TSKprecolumn SWの順となります。通常、ODSカラムで分析可能な薬物のほとんどが、TSKprecolumn BSA-ODS/Sにて前処理することができますが、一部の疎水性の強い薬物においてTSKprecolumn BSA-ODS/Sでは、標準或いは添加血清での回収率が低下する場合があります。このような薬物の場合、TSKprecolumn PWやTSKprecolumn SWを用いると良好な結果が得られます。

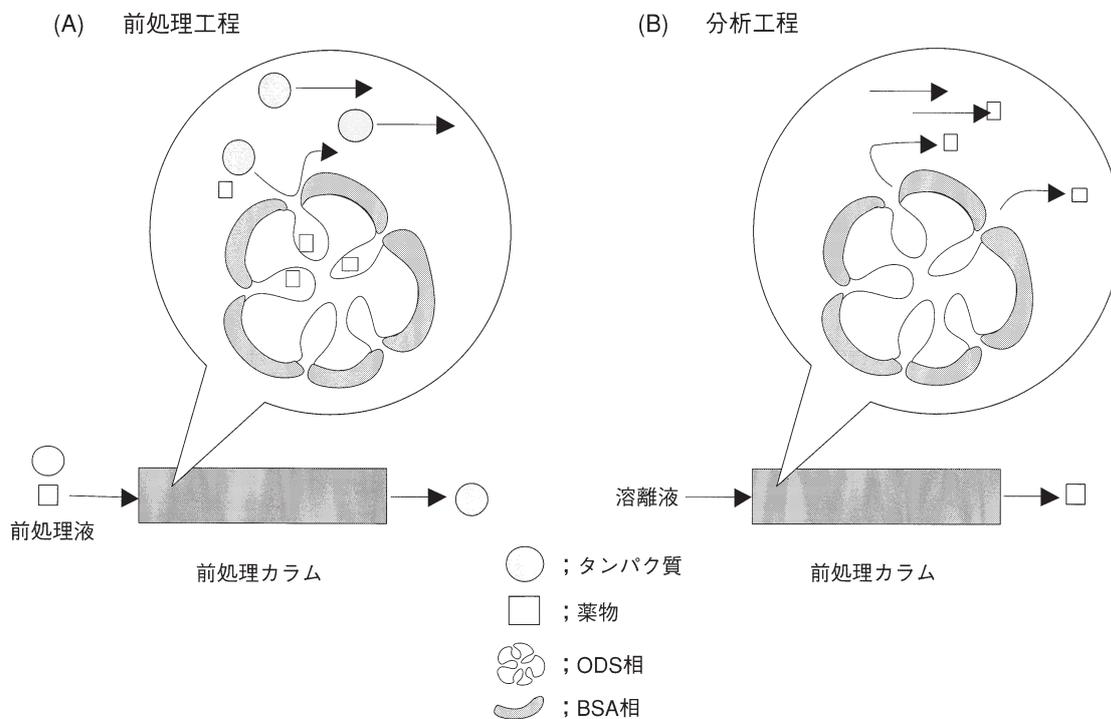


図-2 前処理模式図 (TSKprecolumn BSA-ODS/S)

### 3. 前処理条件の設定

#### 3-1 前処理液及び洗浄液

一般に前処理液は、10～50mmol/lの緩衝液 (pH 3～7) を用います。脂溶性ビタミンのように非常に疎水性の強い物質を前処理する場合、回収率の低下を抑えるために10～20%程度の有機溶媒 (アセトニトリル,メタノール) を添加します。通常、pH6.8の前処理液を用いますが、イオン性の薬物では酸性の前処理液を用いることで良好な結果が得られることがあります。

また、洗浄液を適切に選択することが、前処理カラムの耐久性を向上させるための重要な要因となります。分析用の溶離液で溶出しにくい生体試料中に含まれる疎水性の強い物質は前処理カラムに蓄積されるため、前処理カラムの劣化の原因となります。洗浄液のpH及び有機溶媒濃度の検討を行ったところ、**図-3**に示すように測定毎に有機溶媒を40～50%程度含む中性の緩衝液で洗浄することにより、耐久性が著しく改善され、血清量として50ml注入後も理論段数にほとんど低下が認められませんでした。定期的な洗浄でも、前処理カラムの耐久性に同様の効果が期待でき

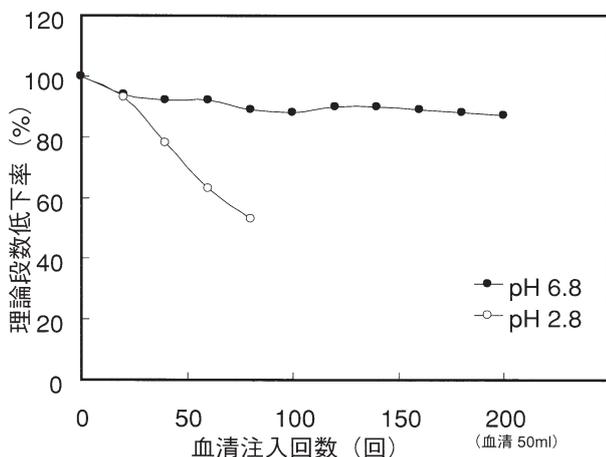


図-3 洗浄液(pH)の耐久性への影響

カラム ; TSKgel Super-ODS (4.6mmI.D.×10cm) (分析カラム)  
TSKprecolumn BSA-ODS/S (4.6mmI.D.×1.0cm) (前処理カラム)  
溶離液 ; 50mmol/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/CH<sub>3</sub>CN = 72/28  
前処理液 ; 50mmol/l リン酸緩衝液 (pH 6.8)  
洗浄液 ; 50mmol/l リン酸緩衝液 (pH 6.8 or 2.8) / CH<sub>3</sub>CN = 60/40  
流速 ; 1.0ml/min (分析), 1.5ml/min (前処理)  
試料 ; 標準添加血清 (カルバマゼピン)  
注入量 ; 500 μl (2倍希釈)

ますが、繰り返し測定時の妨害ピーク (保持力の比較的高い物質) の影響をなくすためにも、測定毎に前処理カラム及び分析カラムの洗浄をお勧めします。

#### 3-2 試料希釈液

生体試料を前処理カラムに直接注入した場合、薬物によっては前処理時に回収率が低下することがあります。抗てんかん薬であるフェノバルビタール (PB)、クロナゼパム (CZP) 及びジアゼパム (DZP) を用いて血清への薬物添加回収率を調べたところ、PB及びCZPでは良好な血清添加回収率が得られるものの、疎水性の強いDZPは、40%と低い回収率を示しました。血清に添加していない場合のDZPの回収率が90%以上であることから、DZPと血清中のタンパク質との間に何らかの相互作用が発生したものと推察されます。このような場合、血清を種々の希釈液で希釈することにより改善することができます。**図-4**に示すように希釈液に200mmol/lの過塩素酸ナトリウム水溶液を用いたところ良好な添加回収率を示しました。

また、ビタミンEのように脂溶性の高い物質は、水溶液に溶解しないため標準試料の回収率が低下してしまいま

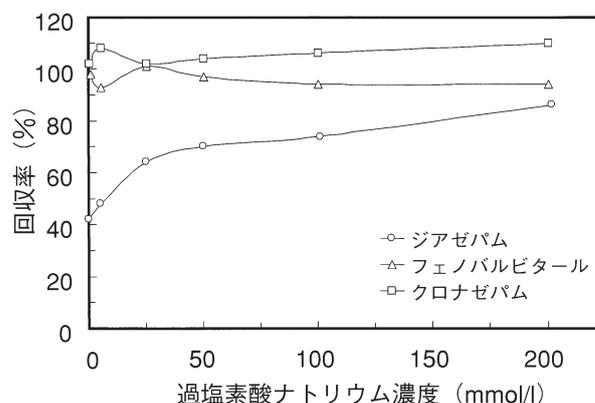


図-4 希釈液中の過塩素酸ナトリウム濃度の回収率への影響

カラム ; TSKgel Super-ODS (4.6mmI.D.×10cm) (分析カラム)  
TSKprecolumn BSA-ODS/S (4.6mmI.D.×1.0cm) (前処理カラム)  
流速 ; 1.0ml/min (分析), 1.5ml/min (前処理)  
希釈液 ; 過塩素酸ナトリウム水溶液  
試料 ; 標準添加血清  
ジアゼパム (20mg/l)  
フェノバルビタール (12.88mg/l)  
クロナゼパム (25 μg/l)  
注入量 ; 500 μl (2倍希釈)

す。有機溶媒を添加することにより回収率が向上しますが、生体試料中に含まれるタンパク質が変性沈殿するため、高い有機溶媒濃度を使用することができません。

有機溶媒と同じ効果が期待できる界面活性剤を用いたところ良好な回収率が得られました。(図-5) さらに種々の界面活性剤による血清からの回収率の比較を行ったところ、イオン性を有するSDSが最も良好な結果を示しました。(図-6) この他に測定物質が酸化還元等を受けやすい場合、安定剤としてアスコルビン酸やEDTAなどの添加が必要となります。このようにカラムスイッチングHPLC法において良好な回収率を得るためには、適切な希釈液を選択することが重要となります。

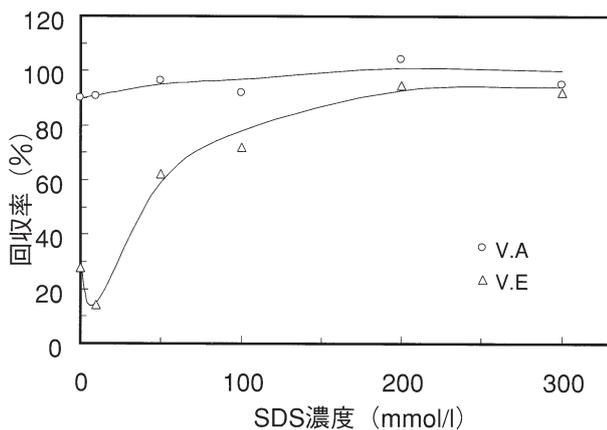


図-5 希釈液中のSDS濃度の回収率への影響

カラム；TSKgel ODS-80Ts (4.6mmI.D.×15cm)  
(分析カラム)  
TSKprecolumn BSA-ODS/S(4.6mmI.D.×1.0cm)  
(前処理カラム)  
流 速；1.0ml/min(分析), 1.5ml/min(前処理)  
希釈液；SDS水溶液/EtOH=70/30  
試 料；ビタミンA(0.4mg/l), ビタミンE(0.4mg/l)  
注入量；300 μl (10倍希釈)

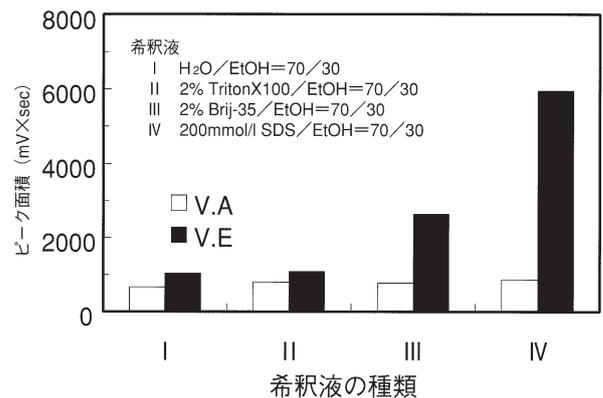


図-6 希釈液中の界面活性剤の種類の影響

カラム；TSKgel ODS-80Ts (4.6mmI.D.×15cm)  
(分析カラム)  
TSKprecolumn BSA-ODS/S(4.6mmI.D.×1.0cm)  
(前処理カラム)  
流 速；1.0ml/min(分析), 1.5ml/min(前処理)  
希釈液；グラフ中に記載  
試 料；標準添加血清(ビタミンA, ビタミンE)  
注入量；300 μl (10倍希釈)

### 3-3 前処理カラム内径とカラム接続方向の影響

前処理カラム TSKprecolumn BSA-ODS/Sとセミマイクロカラムの組み合わせにおける前処理カラムの内径の影響について調べました。表-1に示すように前処理時と逆方向で分析カラムに接続するバックフラッシュと呼ばれる方法は、順方向に接続した場合に比べ拡がり少なく高い理論段数が得られています。また、セミマイクロカラムの場合、特に保持力の弱い物質については、前処理カラムの内径の細かい方が拡がりの影響を受けず高い理論段数が得られます。

バックフラッシュ法では内径3.2mmの前処理カラムに1000  $\mu$ l注入しても、注入量の増加に伴う理論段数の低下がほとんど認められませんでした。(図-7)

表-1 前処理方法及び前処理カラム内径の理論段数への影響

試料	3.2mm I.D. $\times$ 1.5cm		4.6mm I.D. $\times$ 1.0cm	
	順方向	逆方向	順方向	逆方向
フェノバルビタール	8700	15700	4400	6400
カルバマゼピン	8500	23500	5300	20600

カラム； TSKgel ODS-80Ts (2.0mm I.D.  $\times$  15cm) (分析カラム)  
TSKprecolumn BSA-ODS/S (前処理カラム)  
溶離液； 50mmol/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{CH}_3\text{CN} = 72/28$   
前処理液； 50mmol/l リン酸緩衝液 (pH 6.8)  
流速； 0.2ml/min (分析), 0.72ml/min (前処理)  
温度； 40  $^\circ\text{C}$   
注入量； 100  $\mu$ l

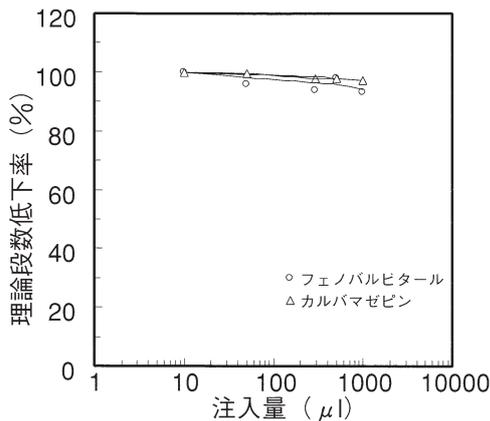


図-7 前処理カラム逆方向接続での試料注入量の理論段数への影響

カラム； TSKgel ODS-80Ts (2.0mm I.D.  $\times$  15cm) (分析カラム)  
TSKprecolumn BSA-ODS/S (3.2mm I.D.  $\times$  1.5cm) (前処理カラム)  
溶離液； 50mmol/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{CH}_3\text{CN} = 72/28$   
前処理液； 50mmol/l リン酸緩衝液 (pH 6.8)  
流速； 0.2ml/min (分析), 0.72ml/min (前処理)  
希釈液； 200mmol/l  $\text{NaClO}_4$

## 4. コンベンショナルカラムとの比較

### 4-1 測定時間と検出感度の比較

測定試料として5種類の抗てんかん薬 (フェノバルビタール (PB), カルバマゼピン (CBZ), フェニトイン (PHT), ニトラゼパム (NZIP), クロナゼパム (CZP)) を、分析カラムに超高速逆相カラム TSKgel Super-ODS (4.6mm I.D.  $\times$  10cm)、逆相コンベンショナルカラム TSKgel ODS-80Ts QA (4.6mm I.D.  $\times$  15cm) 及び逆相セミマイクロカラム TSKgel ODS-80Ts (2.0mm I.D.  $\times$  15cm) を用いて測定比較を行いました。(図-8) 超高速逆相カラム TSKgel Super-ODSは、セミマイクロカラム、コンベンショナルカ

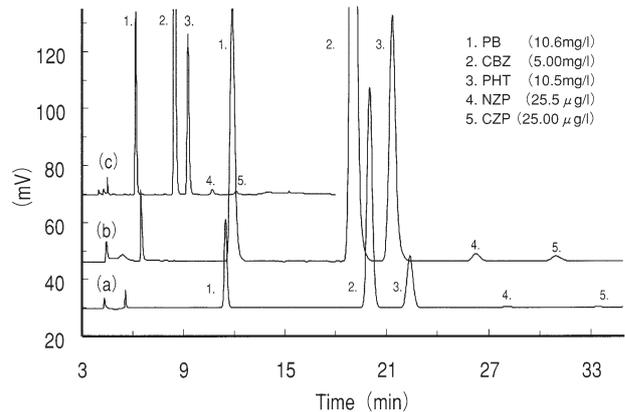


図-8 各種ODSカラムによる抗てんかん薬のクロマトグラムの比較

カラム； (a) TSKgel ODS-80Ts QA (4.6mm I.D.  $\times$  15cm) (分析カラム)  
(b) TSKgel ODS-80Ts (2.0mm I.D.  $\times$  15cm) (分析カラム)  
(c) TSKgel Super-ODS (4.6mm I.D.  $\times$  10cm) (分析カラム)  
TSKprecolumn BSA-ODS/S (4.6mm I.D.  $\times$  1.0cm) (前処理カラム)

溶離液； 50mmol/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{CH}_3\text{CN} = 72/28$   
前処理液； 50mmol/l リン酸緩衝液 (pH 6.8)  
洗浄液； 50mmol/l リン酸緩衝液 (pH 6.8)  
 $\text{CH}_3\text{CN} = 60/40$

流速； (a), (c) 1.0ml/min, (b) 0.2ml/min (分析)  
1.5ml/min (前処理)

溶出条件； 前処理時間 3min, カラム接続時間 (a), (c) 0.5min (b) 5.0min, 洗浄時間 5min

温度； 25  $^\circ\text{C}$

検出； UV (254nm)、マイクロセル使用

注入量； 1000  $\mu$ l (2倍希釈)

ムに比べ約1/3の15分と短い分析時間で測定が可能であり、検出感度もコンベンショナルカラムの約2倍高感度で検出することができます。また、セミマイクロカラムはコンベンショナルカラムとほぼ同じ測定時間を有しますが、検出感度は、超高速逆相カラムの約2.5倍、コンベンショナルカラムの約5倍の高感度で測定が可能となります。

表一 2 に各種 ODS カラムでの標準薬物の検量線と再現性を示します。ごく微量濃度の測定が必要な NZP、CZP においてセミマイクロカラム（内径 2.0mm）では、コンベンショナルカラム（内径 4.6mm）に比べ C.V. 値が低く精度よい測定が行えることがわかります。これは、セミマイクロカラムではコンベンショナルカラムに比べて約 5 倍高感度（ピーク面積で約 5 倍）に測定できることによります。

#### 4-2 試料注入量と再現性

注入量を変えた場合の標準薬物測定の再現性について調べた結果を表一 3 に示します。いずれの薬物も治療濃度範囲においてほぼ原点を通る良好な直線性を有する検量線が得られています。一般に医療分野における血中の薬物濃度測定での測定精度は、C.V. 値を 5 % 以内に抑える必要があると言われていています。PB、CBZ、PHT は、治療濃度が高いため少ない注入量でも 5 % 以内の良好な再現性が得られています。しかしながら、治療濃度の低い NZP、CZP では十分な感度が得られず、試料注入量が 200  $\mu$  l 及び 500  $\mu$  l では、5 % を超える C.V. 値となりました。試料注入量を 1000  $\mu$  l にすることにより NZP、CZP いずれも 3 % 以下の良好な再現性が得られました。

表一 2 各種 ODS カラムでの抗てんかん薬の検量線及び再現性

Sample	TSKgel ODS-80Ts (セミマイクロ)	TSKgel ODS-80Ts QA	TSKgel Super-ODS
PB 検量線(1 次式) (濃度範囲) C.V.%(n=6)	$y=162.02x+38.246$ $R^2=0.9999$ (0.21 ~ 53.0mg/l) 0.90 (2.12mg/l), 1.37 (10.6mg/l)	$y=32.534x+8.3488$ $R^2=0.9998$ (0.21 ~ 53.0mg/l) 0.96 (2.12mg/l), 0.28 (10.6mg/l)	$y=32.253x+6.0437$ $R^2=0.9999$ (0.21 ~ 53.0mg/l) 0.10 (2.12mg/l), 0.28 (10.6mg/l)
CBZ 検量線(1 次式) (濃度範囲) C.V.%(n=6)	$y=1612.9x+120.69$ $R^2=0.9995$ (0.1 ~ 10.0mg/l) 1.73 (1.0mg/l), 1.88 (5.0mg/l)	$y=329.35x+10.432$ $R^2=0.9995$ (0.1 ~ 25.0mg/l) 0.70 (1.0mg/l), 0.61 (5.0mg/l)	$y=316.56x+34.041$ $R^2=0.9999$ (0.1 ~ 25.0mg/l) 0.35 (1.0mg/l), 0.07 (5.0mg/l)
PHT 検量線(1 次式) (濃度範囲) C.V.%(n=6)	$y=209.5x+38.124$ $R^2=0.9999$ (0.21 ~ 52.5mg/l) 1.00 (5.05mg/l), 1.97 (25.50mg/l)	$y=41.977x+9.738$ $R^2=0.9999$ (0.21 ~ 52.5mg/l) 0.75 (5.05mg/l), 0.62 (25.50mg/l)	$y=41.529x+8.7806$ $R^2=0.9999$ (0.21 ~ 52.5mg/l) 0.13 (5.05mg/l), 0.07 (25.50mg/l)
NZP 検量線(1 次式) (濃度範囲) C.V.%(n=6)	$y=3.4814x+1.0079$ $R^2=1.0000$ (0.50 ~ 126.13 $\mu$ g/l) 2.03 (5.05 $\mu$ g/l), 2.01 (25.50 $\mu$ g/l)	$y=0.6956x+0.3644$ $R^2=0.9998$ (1.26 ~ 126.13 $\mu$ g/l) 8.36 (5.05 $\mu$ g/l), 3.29 (25.50 $\mu$ g/l)	$y=0.6939x+0.1805$ $R^2=0.9999$ (0.50 ~ 126.13 $\mu$ g/l) 5.72 (5.05 $\mu$ g/l), 0.70 (25.50 $\mu$ g/l)
CZP 検量線(1 次式) (濃度範囲) C.V.%(n=6)	$y=2.7272x+0.3371$ $R^2=0.9998$ (0.50 ~ 125.0 $\mu$ g/l) 2.76 (5.00 $\mu$ g/l), 1.76 (25.00 $\mu$ g/l)	$y=0.5465x+0.2005$ $R^2=0.9993$ (1.25 ~ 125.0 $\mu$ g/l) 8.04 (5.00 $\mu$ g/l), 1.26 (25.00 $\mu$ g/l)	$y=0.5448x+0.0785$ $R^2=0.9998$ (0.50 ~ 125.0 $\mu$ g/l) 5.25 (5.00 $\mu$ g/l), 1.12 (25.00 $\mu$ g/l)

表一 3 TSKgel ODS-80Ts セミマイクロカラムによる各注入量での検量線及び再現性

Sample	200 $\mu$ l 注入	500 $\mu$ l 注入	1000 $\mu$ l 注入
PB 検量線(1 次式) (濃度範囲) C.V.%(n=6)	$y=34.391x+7.5889$ $R^2=0.9999$ (0.21 ~ 53.0mg/l) 0.96 (2.12mg/l), 1.23 (10.6mg/l)	$y=84.114x+22.629$ $R^2=0.9998$ (0.21 ~ 53.0mg/l) 0.73 (2.12mg/l), 1.19 (10.6mg/l)	$y=162.02x+38.246$ $R^2=0.9999$ (0.21 ~ 53.0mg/l) 0.90 (2.12mg/l), 1.37 (10.6mg/l)
CBZ 検量線(1 次式) (濃度範囲) C.V.%(n=6)	$y=334.43x+34.122$ $R^2=0.9999$ (0.1 ~ 10.0mg/l) 1.11 (2.12mg/l), 2.16 (10.6mg/l)	$y=822.73x+101.64$ $R^2=0.9998$ (0.1 ~ 10.0mg/l) 0.68 (2.12mg/l), 1.37 (10.6mg/l)	$y=1612.9x+120.69$ $R^2=0.9995$ (0.1 ~ 10.0mg/l) 1.73 (2.12mg/l), 1.88 (10.6mg/l)
PHT 検量線(1 次式) (濃度範囲) C.V.%(n=6)	$y=43.901x+8.4041$ $R^2=0.9999$ (0.21 ~ 52.5mg/l) 0.61 (5.05mg/l), 1.78 (25.50mg/l)	$y=107.65x+25.999$ $R^2=0.9999$ (0.21 ~ 52.5mg/l) 0.71 (5.05mg/l), 1.36 (25.50mg/l)	$y=209.5x+38.124$ $R^2=0.9999$ (0.21 ~ 52.5mg/l) 1.00 (5.05mg/l), 1.97 (25.50mg/l)
NZP 検量線(1 次式) (濃度範囲) C.V.%(n=6)	$y=0.7512x+0.4091$ $R^2=1.0000$ (0.50 ~ 126.13 $\mu$ g/l) 10.92 (0.50 $\mu$ g/l), 3.26 (25.50 $\mu$ g/l)	$y=1.7991x+0.3563$ $R^2=0.9998$ (1.26 ~ 126.13 $\mu$ g/l) 6.98 (5.05 $\mu$ g/l), 2.22 (25.50 $\mu$ g/l)	$y=3.4814x+1.0079$ $R^2=1.0000$ (0.50 ~ 126.13 $\mu$ g/l) 2.03 (5.05 $\mu$ g/l), 2.01 (25.50 $\mu$ g/l)
CZP 検量線(1 次式) (濃度範囲) C.V.%(n=6)	$y=0.4989x+0.4547$ $R^2=0.9998$ (0.50 ~ 125.0 $\mu$ g/l) 6.57 (5.00 $\mu$ g/l), 5.43 (25.00 $\mu$ g/l)	$y=1.4098x-0.0644$ $R^2=0.9993$ (1.25 ~ 125.0 $\mu$ g/l) 6.02 (5.00 $\mu$ g/l), 2.16 (25.00 $\mu$ g/l)	$y=2.7272x+0.3371$ $R^2=0.9998$ (0.50 ~ 125.0 $\mu$ g/l) 2.76 (5.00 $\mu$ g/l), 1.76 (25.00 $\mu$ g/l)

### 4-3 血清での回収率及び再現性

標準薬物及び標準薬物添加血清のクロマトグラムを図-9に示します。5種類の抗てんかん薬を同時に測定することができます。また、各薬物とも血清由来の成分ピークの影響を受けることなく良好な分離が得られています。標準試料と同じ濃度になるように薬物を血清に添加した標準添加血清を測定し、得られた各薬物のピーク面積を標準試料のピーク面積と比較して回収率を算出しました。いずれの薬物についても85%以上の高い回収率が得られました。(表-4) 標準添加血清における繰り返し再現性についても5%以下のC.V.値と良好な結果が得られました。セミマイクロカラムを用いたカラムスイッチングHPLC法を用いることにより、従来に比べ高精度に生体試料中の微量成分の測定を行うことが可能であると言えます。

表-4 標準添加血清での回収率及び再現性

薬物	標準添加血清		
	Conc.	Recovery (%)	C.V. (%) (n=6)
PB (mg/l)	2.12	95.06	1.11
	10.60	96.45	1.03
CBZ (mg/l)	1.00	99.20	0.77
	5.00	94.60	1.11
PHT (mg/l)	2.10	98.70	0.79
	10.50	95.55	1.65
NZP ( $\mu$ g/l)	5.05	94.61	1.34
	25.50	90.43	0.88
CZP ( $\mu$ g/l)	5.00	100.93	4.63
	25.00	86.18	1.55

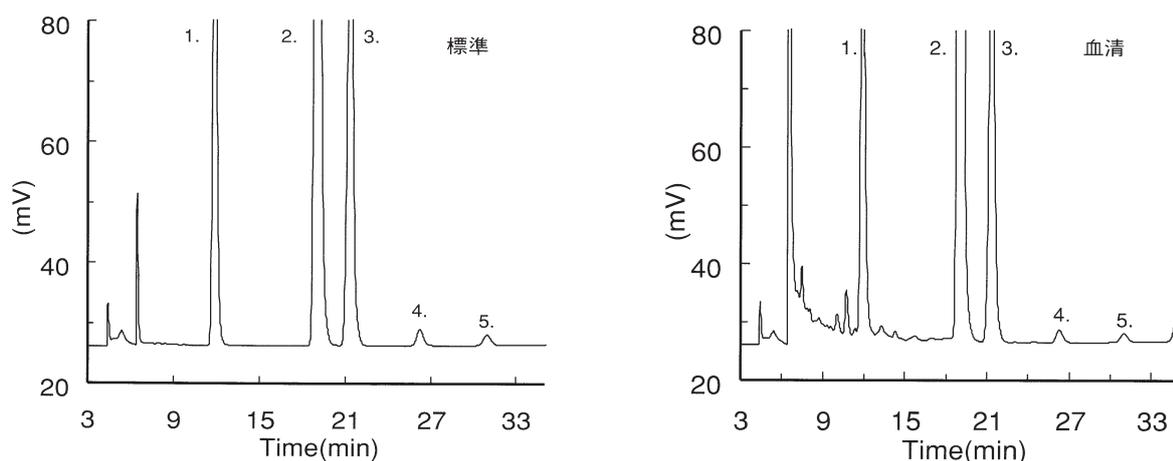


図-9 標準及び標準添加血清のクロマトグラム

カラム；TSKgel ODS-80Ts (2.0mmI.D.×15cm) (分析カラム)  
 TSKprecolumn BSA-ODS/S (4.6mmI.D.×1.0cm) (前処理カラム)  
 溶離液；50mmol/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/CH<sub>3</sub>CN = 72/28  
 前処理液；50mmol/l リン酸緩衝液 (pH6.8)  
 洗浄液；50mmol/l リン酸緩衝液 (pH6.8)/CH<sub>3</sub>CN = 60/40  
 流速；0.2ml/min (分析), 1.5ml/min (前処理)  
 溶出条件；前処理時間 3min, カラム接続時間 5.0min, 洗浄時間 5min  
 温度；25℃  
 検出；UV (254nm)、マイクロセル使用  
 試料；1. PB (10.6mg/l), 2. CBZ (5.00mg/l), 3. PHT (10.5mg/l), 4. NZP (25.5  $\mu$ g/l), 5. CZP (25.00  $\mu$ g/l)  
 注入量；1000  $\mu$ l (2倍希釈)

## 5. 応用例

これまで述べてまいりました、前処理カラム TSKprecolumn BSA-ODS/Sを用いたセミマイクロカラムによるカラムスイッチングHPLC法を、他の薬物に適用した応用例を紹介します。

### 5-1 リドカインの分析

局所麻酔薬、不整脈治療薬であるリドカインの治療濃度

は、1.2～5.2mg/lの血中濃度範囲であるとされています。また、6mg/l以上が中毒濃度と考えられています。図-10に標準リドカイン及び標準添加血清のクロマトグラムを示します。血清由来の成分の妨害を受けることなく良好にリドカインの測定を行うことが可能です。表-5に示すように0.2～51mg/lの広い濃度範囲において、リドカイン濃度とピーク面積の間にはほぼ原点を通る良好な直線関係 ( $r^2=0.9993$ ) が得られました。また、繰り返し再現性 ( $n=6$ ) は、低濃度においても4%以下のC.V.値が得られ、血清への標準添加回収率が90%以上の良好な回収率が得られています。

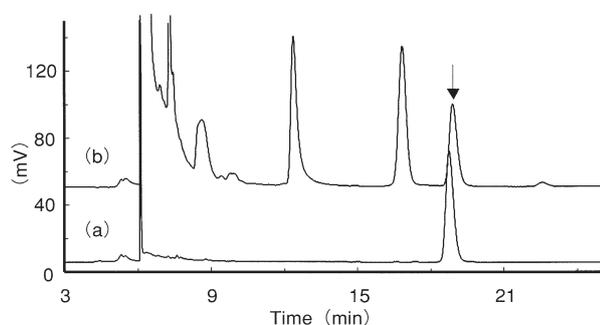


表-5 リドカインの回収率及び再現性

リドカイン	
検量線(1次式) (濃度範囲)	$y=244.99x+52.463$ $R^2=0.9993$ (0.20～51.0mg/l)
C.V.%(n=6)	3.65 (0.51mg/l), 04 (5.10mg/l)
添加回収率(%)	95.10 (0.51mg/l), 92.29 (5.10mg/l)

図-10 リドカインのクロマトグラム

カラム; TSKgel ODS-80Ts  
(2.0mmI.D.×15cm)(分析カラム)  
TSKprecolumn BSA-ODS/S  
(4.6mmI.D.×1.0cm)(前処理カラム)  
溶離液; 50mmol/l リン酸緩衝液 (pH 6.8) /  
CH<sub>3</sub>CN = 60 / 40  
前処理液; 50mmol/l リン酸緩衝液 (pH6.8)  
洗浄液; 溶離液と同一  
流速; 0.2ml/min(分析), 1.5ml/min(前処理)  
溶出条件; 前処理 3min, カラム接続時間 4.0min  
洗浄時間 5min  
温度; 40℃  
検出; UV(254nm)、マイクロセル使用  
試料; (a)リドカイン(5.10mg/l)  
(b)血清添加リドカイン  
注入量; 1000 μl (2倍希釈)

## 5-2 プレドニゾロンの分析

合成副腎皮質ホルモン薬、抗炎症薬であるプレドニゾロンは、慢性・急性副腎皮質機能不全、気管支喘息、アレルギー疾患、湿疹・皮膚炎群等、色々な疾患に広く用いられています。図-11にプレドニゾロン及び水溶性のメチルプレドニゾロンヘミサクシネートを同時測定したクロマトグラムを示します。標準添加血清においてもプレドニゾ

ン、メチルプレドニゾロンヘミサクシネートともほとんど血清由来成分の影響を受けることなく測定することが可能です。薬物濃度とピーク面積の間には、ほぼ原点を通る良好な直線関係 ( $r^2=0.9999, 0.9997$ ) が得られました。また、繰り返し再現性 ( $n=6$ ) は、それぞれ、C.V.%=1.0, 1.41、血清への標準薬物の添加回収率はともに85%以上の良好な結果が得られました。(表-6)

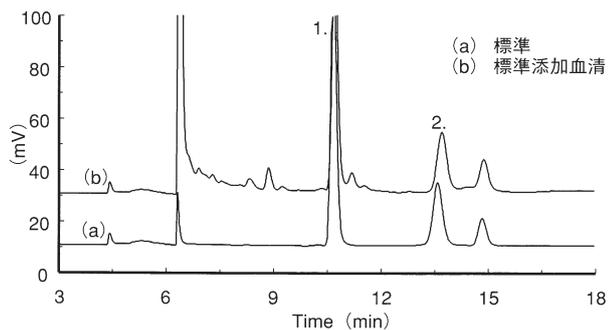


図-11 プレドニゾロンのクロマトグラム

カラム；TSKgel ODS-80Ts  
 (2.0mmI.D.×15cm) (分析カラム)  
 TSK precolumn BSA-ODS/S  
 (4.6mmI.D.×1.0cm) (前処理カラム)  
 溶離液；50mmol/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  /  $\text{CH}_3\text{CN} = 70/30$   
 前処理液；50mmol/l リン酸緩衝液 (pH6.8)  
 洗浄液；50mmol/l リン酸緩衝液 (pH6.8) /  
 $\text{CH}_3\text{CN} = 60/40$   
 流速；0.2ml/min (分析) 1.5ml/min (前処理)  
 溶出条件；前処理時間 3min, カラム接続時間 4.0min  
 洗浄時間 5min  
 温度；40℃  
 検出；UV (254nm)、マイクロセル使用  
 試料；1. プレドニゾロン (1.0mg/l)  
 2. メチルプレドニゾロンヘミサクシネート  
 (1.0mg/l)  
 注入量；500  $\mu\text{l}$  (2倍希釈)

表-6 プレドニゾロンの回収率及び再現性

No. 1	プレドニゾロン
検量線 (1次式)	$y=1248x+20.519$ $R^2=0.9999$
(濃度範囲)	(0.10 ~ 5.0mg/l)
C.V.%(n=6)	1.00 (1.0mg/l)
添加回収率(%)	86.17 (1.0mg/l)
No. 2	メチルプレドニゾロンヘミサクシネート
検量線 (1次式)	$y=450.18x+59.558$ $R^2=0.9997$
(濃度範囲)	(0.10 ~ 25.0mg/l)
C.V.%(n=6)	1.41 (1.0mg/l)
添加回収率(%)	94.4 (1.0mg/l)

## 6. おわりに

セミマイクロカラムを用いたカラムスイッチングHPLC法の検討を行った結果、コンベンショナルカラムを用いた場合に比べ約5倍の高感度で測定を行うことが可能でした。これにより、従来測定精度が低かった極微量の薬物についても再現性良く血中薬物濃度の測定を行うことができます。また、前処理条件を最適化することにより回収率や耐久性を向上することが可能となります。このようにカラムスイッチングHPLC法において分析カラムにセミマイクロカラムを用いることにより、生体試料中の薬物測定を簡便に行えるだけでなく、より微量の薬物への適用が期待できます。

### 参考文献

- 1) 渡辺 淳：“薬物治療適性のための薬物血中濃度測定の実際”,p.3 (1981), (薬業時報社).
- 2) H. Yosida, I. Morita, T.Masujima, H. Imai: *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 3827 (1982).
- 3) I. Morita, T. Masujima, H. Yosida, H. Imai: *Bunseki Kagaku*,**33**, E235 (1984).
- 4) G. Tamai, I. Morita, T. Masujima, H. Yosida, H. Imai: *J. Pharm. Sci.*, **73**, 1825 (1984).
- 5) I. Morita, T. Masujima, H. Yosida, H. Imai: *Anal. Biochem.*, **151**, 358 (1985).
- 6) “前処理用充填カラムを用いた分析条件の検討” セバレーションレポートNo.68

※“TSKgel”は東ソー株式会社の登録商標です。



TOSOH

## 東ソー株式会社 バイオサイエンス事業部

東京本社 営業部	☎ (03) 6636-3733	〒104-0028	東京都中央区八重洲2-2-1
大阪支店 バイオエス	☎ (06) 6209-1948	〒541-0043	大阪市中央区高麗橋4-4-9
名古屋支店 バイオエス	☎ (052) 211-5730	〒460-0008	名古屋市中区栄1-2-7
福岡支店	☎ (092) 710-6694	〒812-0011	福岡市博多区博多駅前3-8-10
仙台支店	☎ (022) 266-2341	〒980-0014	仙台市青葉区本町1-11-1
カスタマーサポートセンター	☎ (0467) 76-5384	〒252-1123	神奈川県綾瀬市早川2743-1

お問い合わせe-mail [tskgel@tosoh.co.jp](mailto:tskgel@tosoh.co.jp)

バイオサイエンス事業部ホームページ <https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/>